

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. November 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/81619 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

[DE/DE]; Mittelstedter Weg 37, 61348 Bad Homburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01025

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. März 2001 (17.03.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AT, AU, BR, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, LT, LU, MA, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, TR, TT, TZ, US, VN, ZA.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
200 07 378.8 22. April 2000 (22.04.2000) DE
60/219,421 20. Juli 2000 (20.07.2000) US
100 60 256.8 4. Dezember 2000 (04.12.2000) DE

(71) Anmelder und

Veröffentlicht:

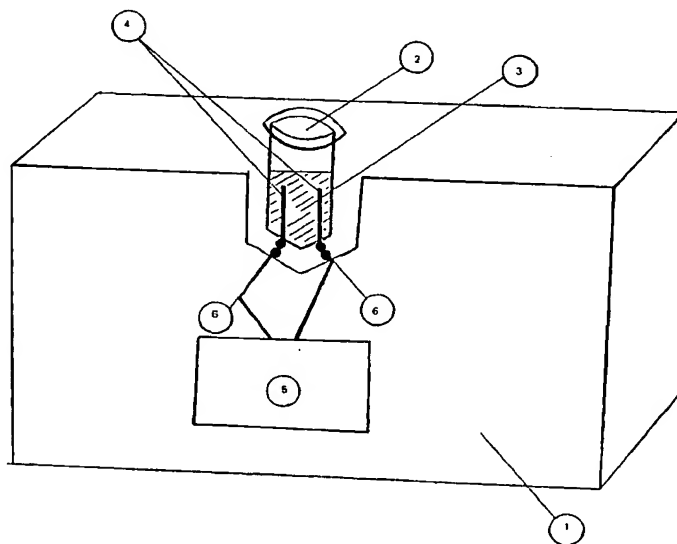
(72) Erfinder: ARNETH, Borros [DE/DE]; Mittelstedter Weg 37, 61348 Bad Homburg (DE). ARNETH, Alfons

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CONDUCTIVITY PCR

(54) Bezeichnung: KONDUKTIVITÄTS-PCR (LEITFÄHIGKEITS-PCR)



(57) Abstract: The activity of individual genes is an important subject of analysis in molecular biology. Often, a PCR (polymerase chain reaction) or an RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) is carried out in order to determine the activity of individual genes. However, a complication associated with this is that the PCR is difficult to quantify. The invention is based on the concept of using the change in conductivity to be measured during the PCR as a marker for the progression of the PCR and for the quantification of the starting quantity of DNA. This apparatus determines the changes in conductivity "online" during the course of a PCR by means of small microelectrodes which are immersed in the PCR solution. Using this parameter, the apparatus is able to calculate the quantity of DNA or RNA before the conclusion of the PCR.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/81619 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Eine in der Molekularbiologie wichtige Fragestellung ist die nach der Aktivität einzelner Gene. Um einzelne Gene in ihrer Aktivität zu bestimmen, wird häufig eine PCR (Polymerasekettenreaktion) oder eine RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt. Eine Schwierigkeit besteht darin, daß die PCR-Reaktion nur schwierig quantifizierbar ist. Dieser Erfindung liegt die Überlegung zugrunde die bei Ablauf der PCR-Reaktion zu messende Leitfähigkeitsänderung als Marker für den Verlauf der PCR-Reaktion und die Quantifizierung der Ausgangs-DNA - Menge zu nutzen. Dieser Apparat bestimmt während dem Ablauf einer PCR-Reaktion "online" mittels kleiner Mikroelektroden, die in die PCR-Lösung eintauchen, die Leitfähigkeitsänderungen. Aufgrund dieses Parameters ist der Apparat in der Lage die DNA bzw. RNA-Menge vor Ablauf der PCR-Reaktion zu errechnen.

Beschreibung:KONDUKTIVITÄTS-PCR (Leitfähigkeits PCR)

Eine in der **Molekularbiologie** wichtige Fragestellung ist die nach der Aktivität einzelner Gene. Um einzelne Gene in ihrer Aktivität zu bestimmen wird häufig eine PCR (Polymerasekettenreaktion) oder eine RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt. Eine Schwierigkeit besteht darin, daß die PCR-Reaktion nur schwierig quantifizierbar ist, daß heißt die Menge an DNA/RNA vor Ablauf der PCR-Reaktion läßt sich nur abschätzen.

Bisher übliche Apparate zur „online“ PCR färben entweder die im Verlauf der PCR gebildete DNA oder verwenden fluoreszenzmarkierte Oligonucleotidprimer um den Verlauf der PCR zu quantifizieren. Dabei ist ein aufwendiges optisches System zur Messung der jeweiligen Fluoreszenzen nötig.

Dieser Erfindung liegt die Überlegung zugrunde die bei Ablauf der PCR-Reaktion entstehende Menge an Phosphat und die damit verbundene Leitfähigkeitsänderungen als Marker für den Verstärkungsfaktor der PCR-Reaktion zu nutzen. Dieser Apparat bestimmt während dem Ablauf einer PCR-Reaktion „online“ mittels kleiner Mikroelektroden, die in die PCR-Lösung eintauchen, den Phosphatanstieg. Aufgrund dieses Parameters ist der Apparat in der Lage die DNA bzw. RNA- Menge vor Ablauf der PCR-Reaktion zu errechnen.

Die Phosphatmenge wird dabei aufgrund ihrer guten spezifischen elektrischen Leitfähigkeit und aufgrund ihres Anstiegs im Verlauf der Annealing und Extension-phase der PCR als Marker zur Detektion gewählt. Anhand einer zuvor ermittelten Eichkurve und der bestimmten Meßwerte kann anschließend ein Mikroprozessor die Phosphatkonzentration nach Ablauf der PCR-Reaktion, den Verstärkungsfaktor der PCR-Reaktion sowie die DNA- bzw. die RNA-Konzentration vor Beginn der PCR-Reaktion errechnen. Dabei eignet sich der zeitliche Verlauf des Leitfähigkeitsanstiegs als Funktion der Zyklenzahl und der Temperatur zur Ermittlung der Ursprungskonzentration an DNA.

Vorteilhaft an dieser Erfindung ist, daß mit der Leitfähigkeit direkt ein elektronisch verwertbares Maß verwendet wird. Zudem ist die Phosphatmenge ein besonders empfindlicher Parameter. Die Leitfähigkeit ändert sich dabei innerhalb eines jeden Zyklus temperaturabhängig entsprechend den drei Phasen (Annealing, Extension, Denaturierung). Insgesamt nimmt die Leitfähigkeit dabei im Verlauf der PCR ab. In der Annealingphase nimmt die Leitfähigkeit relativ stark ab. In den ersten circa zehn Zyklen steigt die Leitfähigkeit linear („lineare Phase“) bis zum „Trashhold Zyklus“. Dieser Zyklus eignet sich in besonderer Weise zur Quantifizierung der Polymerasekettenreaktion. Ab dem Trashhold Zyklus beginnt die exponentielle Phase. Diese ist durch eine summarische Leitfähigkeitsabnahme gekennzeichnet. Dennoch bleibt auch hier während der Denaturierungsphase und der Extensionsphase eine phasenweise Leitfähigkeitszunahme erhalten. Die Leitfähigkeitsänderungen der einzelnen Phasen eignen sich ebenfalls zur PCR-Quantifizierung.

Möglicherweise binden bei der Annealingtemperatur viele Mononucleotide und viele Magnesiumionen sowie andere Ionen an die DNA. Mit Beginn der Extensionsphase steigt die Leitfähigkeit kontinuierlich bis zum Ende der Extensionsphase an. Dieser Anstieg wird vermutlich durch die Phosphatfreisetzung bewirkt. Und muß gemessen werden. An die Elongationsphase schließt sich die Denaturierung an, hier steigt die Leitfähigkeit auf ein Maximum. Vermutlich dissoziieren in dieser Phase alle Ionen ab.

Erläuterung anhand eines Ausführungsbeispiels: Zeichnung

- 1) Thermocycler
- 2) PCR-Reaktionsgefäß
- 3) PCR-Reaktionslösung
- 4) Mikroelektroden zur Leitfähigkeitsmessung
- 5) Mikroprozessor zur Registrierung der Leitfähigkeitsmeßwerte
- 6) Kontakte

Konduktivitäts-PCRPatentansprücheUnabhängiger Hauptanspruch:

1.) Ein Apparat zur Durchführung einer PCR-Reaktion (Polymerasekettenreaktion) in einem sogenannten "Thermocycler",

dadurch gekennzeichnet,

daß dieser Apparat „online“ während dem Ablauf einer PCR-Reaktion mittels kleiner in die PCR-Lösung eintauchender Mikroelektroden die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit der Lösung kontinuierlich oder diskontinuierlich (z.B. nur während der Annealing/Extension-phase oder nur während der ersten Zyklen) verfolgt.

Abhängige Nebenansprüche:

2.) Ein Thermocycler nach Schutzanspruch 1)

dadurch gekennzeichnet,

daß dieser Thermocycler den Übergang des linearen Leitfähigkeitsanstiegs zum ersten Leitfähigkeitsabfall als trash-hold cycle zur Quantifizierung nutzt.

3.) Reaktionsgefäße zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion,

dadurch gekennzeichnet,

daß Mikroelektroden in die verwendeten Reaktionsgefäße integriert sind.

4.) Eine Multi well Platte zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion,

dadurch gekennzeichnet,

daß Mikroelektroden in die einzelnen Wells der multi well Platte integriert sind.

5.) Ein Thermocycler nach Schutzanspruch 1-4,

zusätzlich dadurch gekennzeichnet,

daß neben der elektrischen Leitfähigkeit auch noch die aktuelle Temperatur in der Reaktionslösung gemessen wird, daß die verschiedenen bekannten Möglichkeiten zur Heizung / Kühlung (z.B. Luftheizung / Kühlung oder Peltierelemente) Anwendung finden und das Kontakte zur Verwendung der Reaktionsgefäße nach Schutzanspruch 3 und 4 vorhanden sind.

6.) Eine elektrische Apparatur,

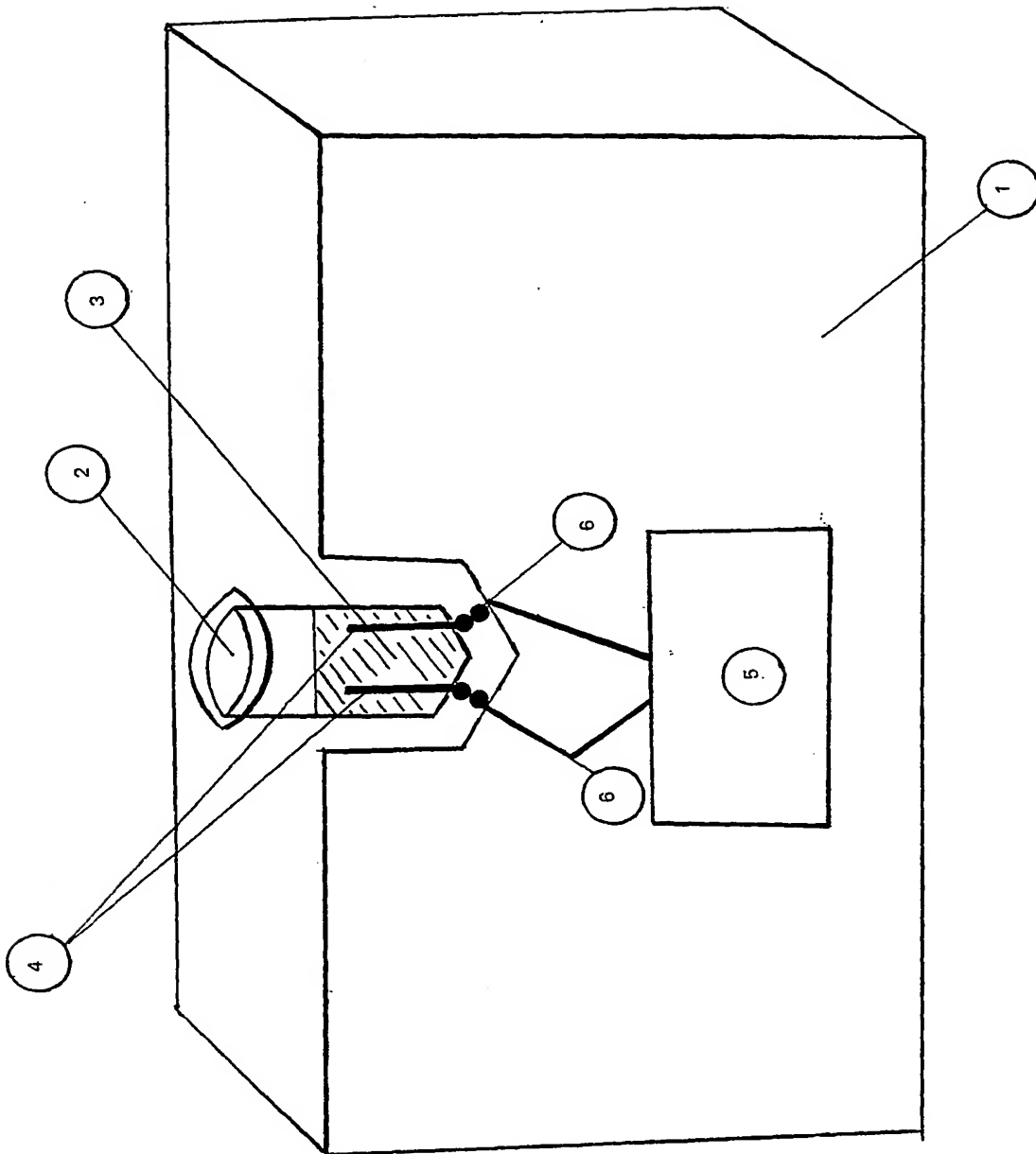
dadurch gekennzeichnet,

daß diese die im Verlauf der Polymerasekettenreaktion gemessenen Parameter (es sind dies die elektrische Leitfähigkeit, Temperatur, Zykluszahl und Zeit) registriert und sinnvoll verknüpft.

7.) Ein Thermocycler nach Schutzanspruch 1-4 mit der Möglichkeit zur abschließenden Schmelzkurvenanalyse,

zusätzlich dadurch gekennzeichnet,

daß während der Schmelzkurvenanalyse die elektrische Leitfähigkeit gemessen wird.



ERSATZBLATT (REGEL 26)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. November 2001 (01.11.2001)

PCT

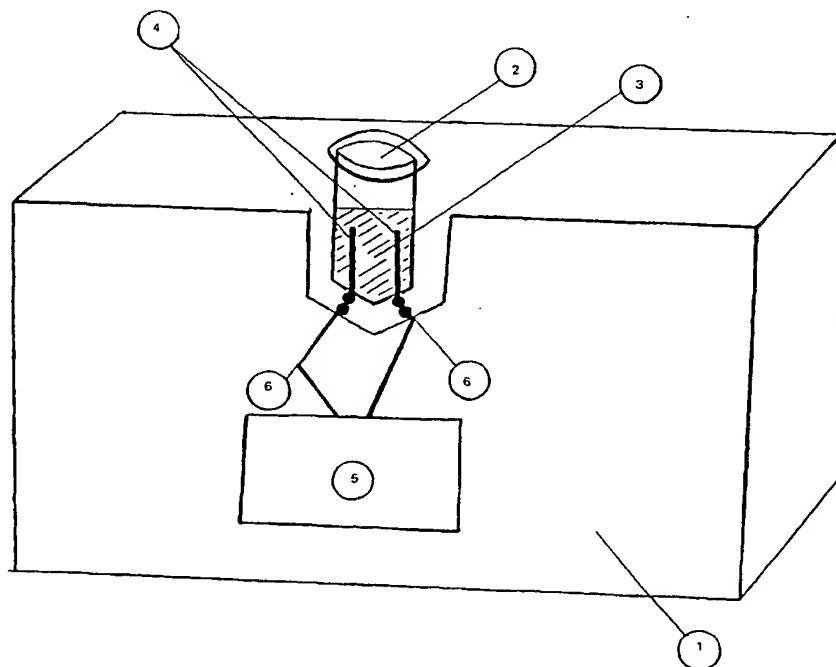
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/81619 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68** 200 18 005.3 22. Oktober 2000 (22.10.2000) DE
100 60 256.8 4. Dezember 2000 (04.12.2000) DE
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01025
- (22) Internationales Anmeldedatum:
17. März 2001 (17.03.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
200 07 378.8 22. April 2000 (22.04.2000) DE
200 07 376.1 22. April 2000 (22.04.2000) DE
60/204.192 8. Mai 2000 (08.05.2000) US
60/219.421 20. Juli 2000 (20.07.2000) US
60/219 422 20. Juli 2000 (20.07.2000) US
200 13 567.8 8. August 2000 (08.08.2000) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: **ARNETH, Borros** [DE/DE]; Mittelstadter
Weg 37, 61348 Bad Homburg (DE). **ARNETH, Alfons**
[DE/DE]; Mittelstadter Weg 37, 61348 Bad Homburg
(DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AT, AU, BR, CA,
CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, IL, IN, IS, JP, KE,
KP, KR, LT, LU, MA, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE,
TR, TT, TZ, US, VN, ZA.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CONDUCTIVITY PCR

(54) Bezeichnung: KONDUKTIVITÄTS-PCR (LEITFÄHIGKEITS-PCR)



(57) Abstract: The invention is based on the concept of using the change in conductivity to be measured during the PCR as a marker for the progression of the PCR and for the quantification of the starting quantity of DNA. This apparatus determines the changes in conductivity "online" during the course of a PCR by means of small microelectrodes (4) which are immersed in the PCR solution. Using this parameter, the apparatus is able to calculate the quantity of DNA or RNA before the conclusion of the PCR.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/81619 A3



OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:

16. Mai 2002

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Dieser Erfindung liegt die Überlegung zugrunde die bei Ablauf der PCR-Reaktion zu messende Leitfähigkeitsänderung als Marker für den Verlauf der PCR-Reaktion und die Quantifizierung der Ausgangs-DNA - Menge zu nutzen. Dieser Apparat bestimmt während dem Ablauf einer PCR-Reaktion "online" mittels kleiner Mikroelektroden (4), die in die PCR-Lösung eintauchen, die Leitfähigkeitsänderungen. Aufgrund dieses Parameters ist der Apparat in der Lage die DNA bzw. RNA-Menge vor Ablauf der PCR-Reaktion zu errechnen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/01025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 10530 A (CLARKSON JOHN MICHAEL ; COBB BENJAMIN DAVID (GB); MOLECULAR SENSORS) 4 March 1999 (1999-03-04) page 9, paragraph 2 ---	1
Y	EP 0 488 769 A (PERKIN ELMER CETUS INSTR) 3 June 1992 (1992-06-03) abstract ---	1
A	US 5 891 639 A (HARLEY CALVIN BRUCE ET AL) 6 April 1999 (1999-04-06) column 22, line 5 - line 54 --- -/--	3,4

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2002

Date of mailing of the international search report

07/03/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCT/DE 01/01025

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. P. SCHONFIELD: "a rapid semi-automated microtiter plate method for analysis and sequencing by PCR from bacterial stocks" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 22, 1989, page 9498 XP001053732 the whole document -----	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/01025

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9910530	A	04-03-1999	CN 1267336 T	20-09-2000
			EP 0990050 A1	05-04-2000
			WO 9910530 A1	04-03-1999
			JP 2001514376 T	11-09-2001
EP 0488769	A	03-06-1992	AT 165621 T	15-05-1998
			AU 696482 B2	10-09-1998
			AU 2493495 A	07-12-1995
			AU 662494 B2	07-09-1995
			AU 8832791 A	04-06-1992
			AU 9700298 A	04-03-1999
			CA 2056743 A1	30-05-1992
			DE 69129325 D1	04-06-1998
			DE 69129325 T2	10-09-1998
			DE 488769 T1	17-12-1992
			DE 812621 T1	13-08-1998
			DE 810030 T1	24-09-1998
			DK 488769 T3	07-10-1998
			EP 1157744 A1	28-11-2001
			EP 0488769 A2	03-06-1992
			EP 0812621 A1	17-12-1997
			EP 0810030 A1	03-12-1997
			ES 2033640 T1	01-04-1993
			GR 92300125 T1	16-03-1993
			IE 914170 A1	03-06-1992
			IL 100209 A	15-03-1995
			IL 111091 A	31-12-1995
			IL 111092 A	18-06-1996
			JP 6233670 A	23-08-1994
			KR 236506 B1	15-01-2000
			NZ 240800 A	26-10-1995
			NZ 270628 A	26-10-1995
			NZ 270629 A	26-10-1995
			US 5282543 A	01-02-1994
			US 5710381 A	20-01-1998
			US 6015534 A	18-01-2000
			US 5602756 A	11-02-1997
			US 5475610 A	12-12-1995
US 5891639	A	06-04-1999	US 5863726 A	26-01-1999
			US 5837453 A	17-11-1998
			US 5629154 A	13-05-1997
			US 5989807 A	23-11-1999
			US 5830644 A	03-11-1998
			US 5645986 A	08-07-1997
			AU 6380896 A	15-05-1997
			JP 11507839 T	13-07-1999
			WO 9715687 A1	01-05-1997
			US 5804380 A	08-09-1998
			AT 193554 T	15-06-2000
			AU 682082 B2	18-09-1997
			AU 1209095 A	29-05-1995
			AU 6058298 A	04-06-1998
			CA 2173872 A1	18-05-1995
			DE 69424797 D1	06-07-2000
			DE 69424797 T2	28-12-2000
			DK 728207 T3	02-10-2000
			EP 0728207 A1	28-08-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/01025

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5891639	A	ES 2147602 T3	16-09-2000
		GR 3034249 T3	29-12-2000
		JP 11243998 A	14-09-1999
		JP 2875394 B2	31-03-1999
		JP 9502102 T	04-03-1997
		PT 728207 T	30-11-2000
		WO 9513381 A1	18-05-1995
		US 5648215 A	15-07-1997
		US 5639613 A	17-06-1997
		US 5693474 A	02-12-1997
		AU 1178195 A	29-05-1995
		AU 1330795 A	29-05-1995
		WO 9513382 A1	18-05-1995
		US 5686306 A	11-11-1997
		WO 9513383 A1	18-05-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01025

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 10530 A (CLARKSON JOHN MICHAEL ; COBB BENJAMIN DAVID (GB); MOLECULAR SENSORS) 4. März 1999 (1999-03-04) Seite 9, Absatz 2	1
Y	EP 0 488 769 A (PERKIN ELMER CETUS INSTR) 3. Juni 1992 (1992-06-03) Zusammenfassung	1
A	US 5 891 639 A (HARLEY CALVIN BRUCE ET AL) 6. April 1999 (1999-04-06) Spalte 22, Zeile 5 - Zeile 54	3, 4
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Februar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/03/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Duchatellier, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J. P. SCHONFIELD: "a rapid semi-automated microtiter plate method for analysis and sequencing by PCR from bacterial stocks" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 17, Nr. 22, 1989, Seite 9498 XP001053732 das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALE^P RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung..., die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01025

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9910530	A	04-03-1999	CN	1267336 T	20-09-2000
			EP	0990050 A1	05-04-2000
			WO	9910530 A1	04-03-1999
			JP	2001514376 T	11-09-2001
<hr/>					
EP 0488769	A	03-06-1992	AT	165621 T	15-05-1998
			AU	696482 B2	10-09-1998
			AU	2493495 A	07-12-1995
			AU	662494 B2	07-09-1995
			AU	8832791 A	04-06-1992
			AU	9700298 A	04-03-1999
			CA	2056743 A1	30-05-1992
			DE	69129325 D1	04-06-1998
			DE	69129325 T2	10-09-1998
			DE	488769 T1	17-12-1992
			DE	812621 T1	13-08-1998
			DE	810030 T1	24-09-1998
			DK	488769 T3	07-10-1998
			EP	1157744 A1	28-11-2001
			EP	0488769 A2	03-06-1992
			EP	0812621 A1	17-12-1997
			EP	0810030 A1	03-12-1997
			ES	2033640 T1	01-04-1993
			GR	92300125 T1	16-03-1993
			IE	914170 A1	03-06-1992
			IL	100209 A	15-03-1995
			IL	111091 A	31-12-1995
			IL	111092 A	18-06-1996
			JP	6233670 A	23-08-1994
			KR	236506 B1	15-01-2000
			NZ	240800 A	26-10-1995
			NZ	270628 A	26-10-1995
			NZ	270629 A	26-10-1995
			US	5282543 A	01-02-1994
			US	5710381 A	20-01-1998
			US	6015534 A	18-01-2000
			US	5602756 A	11-02-1997
			US	5475610 A	12-12-1995
<hr/>					
US 5891639	A	06-04-1999	US	5863726 A	26-01-1999
			US	5837453 A	17-11-1998
			US	5629154 A	13-05-1997
			US	5989807 A	23-11-1999
			US	5830644 A	03-11-1998
			US	5645986 A	08-07-1997
			AU	6380896 A	15-05-1997
			JP	11507839 T	13-07-1999
			WO	9715687 A1	01-05-1997
			US	5804380 A	08-09-1998
			AT	193554 T	15-06-2000
			AU	682082 B2	18-09-1997
			AU	1209095 A	29-05-1995
			AU	6058298 A	04-06-1998
			CA	2173872 A1	18-05-1995
			DE	69424797 D1	06-07-2000
			DE	69424797 T2	28-12-2000
			DK	728207 T3	02-10-2000
			EP	0728207 A1	28-08-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01025

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5891639 A		ES 2147602 T3	16-09-2000
		GR 3034249 T3	29-12-2000
		JP 11243998 A	14-09-1999
		JP 2875394 B2	31-03-1999
		JP 9502102 T	04-03-1997
		PT 728207 T	30-11-2000
		WO 9513381 A1	18-05-1995
		US 5648215 A	15-07-1997
		US 5639613 A	17-06-1997
		US 5693474 A	02-12-1997
		AU 1178195 A	29-05-1995
		AU 1330795 A	29-05-1995
		WO 9513382 A1	18-05-1995
		US 5686306 A	11-11-1997
		WO 9513383 A1	18-05-1995

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. November 2001 (01.11.2001)

PCT

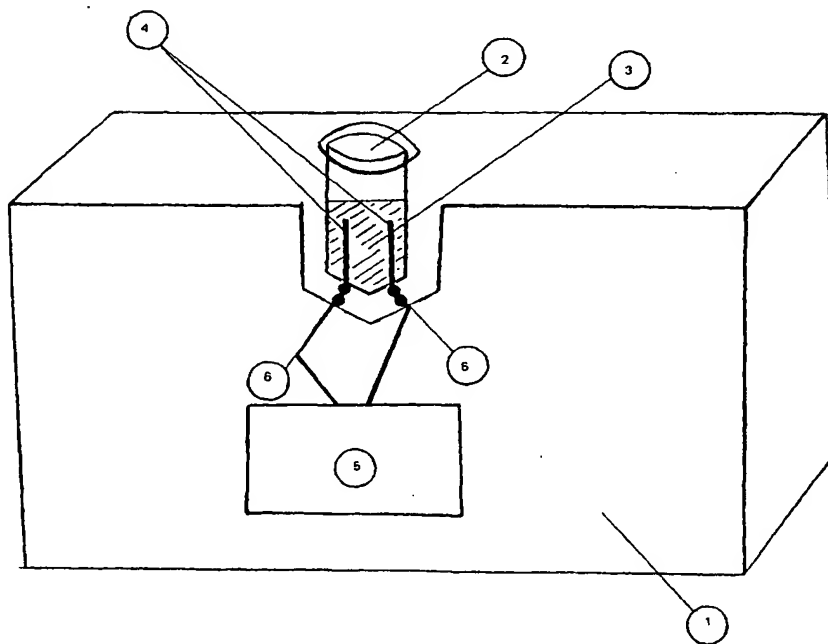
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/81619 A3

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	C12Q 1/68	60/219.421	20. Juli 2000 (20.07.2000)	US
		60/219.422	20. Juli 2000 (20.07.2000)	US
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE01/01025	200 13 567.8	8. August 2000 (08.08.2000)	DE
		200 18 005.3	22. Oktober 2000 (22.10.2000)	DE
(22) Internationales Anmeldedatum:		100 60 256.8	4. Dezember 2000 (04.12.2000)	DE
	17. März 2001 (17.03.2001)			
(25) Einreichungssprache:	Deutsch	(71) Anmelder und		
(26) Veröffentlichungssprache:	Deutsch	(72) Erfinder: ARNETH, Borros [DE/DE]; Mittelstedter		
		Weg 37, 61348 Bad Homburg (DE). ARNETH, Alfons		
		[DE/DE]; Mittelstedter Weg 37, 61348 Bad Homburg		
		(DE).		
(30) Angaben zur Priorität:		(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AT, AU, BR, CA,		
200 07 378.8	22. April 2000 (22.04.2000)	DE		
200 07 376.1	22. April 2000 (22.04.2000)	DE		
60/204.192	8. Mai 2000 (08.05.2000)	US		
		CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, IL, IN, IS, JP, KE,		
		KP, KR, LT, LU, MA, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE,		
		TR, TT, TZ, US, VN, ZA.		

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CONDUCTIVITY PCR

(54) Bezeichnung: KONDUKTIVITÄTS-PCR (LEITFÄHIGKEITS-PCR)



(57) Abstract: The invention is based on the concept of using the change in conductivity to be measured during the PCR as a marker for the progression of the PCR and for the quantification of the starting quantity of DNA. This apparatus determines the changes in conductivity "online" during the course of a PCR by means of small microelectrodes (4) which are immersed in the PCR solution. Using this parameter, the apparatus is able to calculate the quantity of DNA or RNA before the conclusion of the PCR.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/81619 A3



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(48) **Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten Fassung:**

13. Juni 2002

(15) **Informationen zur Berichtigung:**

siehe PCT Gazette Nr. 24/2002 vom 13. Juni 2002, Section II

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:**

16. Mai 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Dieser Erfindung liegt die Überlegung zugrunde die bei Ablauf der PCR-Reaktion zu messende Leitfähigkeitsänderung als Marker für den Verlauf der PCR-Reaktion und die Quantifizierung der Ausgangs-DNA - Menge zu nutzen. Dieser Apparat bestimmt während dem Ablauf einer PCR-Reaktion "online" mittels kleiner Mikroelektroden (4), die in die PCR-Lösung eintauchen, die Leitfähigkeitsänderungen. Aufgrund dieses Parameters ist der Apparat in der Lage die DNA bzw. RNA-Menge vor Ablauf der PCR-Reaktion zu errechnen.